

ماستوسیت‌های برآمده از محیط کشت حاوی اینترلوکین -۳ موجب سلول‌کشی طبیعی سلول‌های سرطانی می‌شوند

دکتر هدایت‌اله شیرزاده

چکیده:

سلول‌های سلول‌کشی طبیعی (Natural Cytotoxic = NC) به عنوان یکی از بازوهای سیستم ایمنی ذاتی نابودکننده سرطان در انسان و حیوانات مطرح هستند. شاخص NC-1.1 نیز به عنوان یکی از ریسپتورهای موجود بر سطح این سلول‌ها گزارش شده است. علیهذا هویت این سلول‌ها و نیز نقش ریسپتور یا ریسپتورهای موجود بر آنها به خوبی مشخص نیست. از طریق کشت سلول‌های طحال موش در آزمایشگاه و با استفاده از آنتی‌بادی ضد ریسپتور NC-1.1 این مطالعه بر آن است تا به سؤالات فوق پاسخ دهد. سلول‌های طحال موش از نژاد CBA در محیط کشت حاوی اینترلوکین -۳ (IL-3) پرورش داده شد و خاصیت سلول‌کشی طبیعی آن در مراحل مختلف رشد به روش آزمایش سلول‌کشی (Cytotoxic assay) بررسی شد. هویت این سلول‌ها با استفاده از رنگ آمیزی گیمسا و آلسین بلو (Alcian blue) نیز با استفاده از پروتئاز اختصاصی ماستوسیت‌ها تعیین گردید. به علاوه ریسپتورهای سطحی این سلول‌ها به کمک روش فلوئوسیتومتری در مراحل مختلف رشد در محیط کشت مشخص گردید. سلول‌های پرورش یافته در محیط کشت حاوی Mouse Mast Cell Line, IL-3 (MCL) نامیده شدند. این سلول‌ها درشت و دانه دار (گرانولار) بوده و سیتوپلاسم فراوان داشتند. ۹۰ درصد این سلول‌ها با رنگ آمیزی اختصاصی ماستوسیت‌ها موسوم به آلسین بلو رنگ شدند. همچنین با استفاده از cDNA وجود پروتئاز mMCP-5 اختصاصی ماستوسیت‌ها تأیید گردید. به علاوه مشخص گردید که این سلول‌ها فاقد ریسپتورهای مخصوص سلول‌های ماکروفاژ، B، T و NK (Natural Killer Cell) هستند، ولی دارای ریسپتور CD32/CD16 شاخص بخش FC آنتی‌بادی و نیز ریسپتور NC-1.1 که میانجی سلول‌کشی طبیعی این سلول‌ها در از بین بردن سلول‌های توموری WEHI-164 که یک نوع فیبروسارکوما است می‌باشند. این خاصیت با افزایش عمر سلول‌ها در محیط کشت تقویت می‌گردد. نتیجه این که سلول‌های پرورش یافته در محیط کشت حاوی IL-3 ماستوسیت‌هایی هستند که فاقد شاخص‌های سلول‌های ماکروفاژ، B، T و NK بوده و با کسب ریسپتور NC-1.1 سلول‌کشی طبیعی را بر علیه فیبروسارکوما WEHI-164 برقرار می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: ایمنی ذاتی، فیبروسارکوما، اینترلوکین -۳، سلول‌کشی طبیعی، ماستوسیت.

مقدمه:

سلول‌کشی طبیعی با واسطه سلولی (Natural Cell Mediated Cytotoxicity = NCMC)	محسوب می‌شود. کشتندگی طبیعی (natural killing) و سلول‌کشی طبیعی (natural cytotoxicity) از عوامل مهم مکانیسم NCMC محسوب می‌شوند (۲۶). سلول کشی طبیعی بر علیه فیبروسارکوما ایجاد شده توسط
مکانیسم عمده ایمنی ذاتی سلولی علیه عفونت‌های ویروسی و ارگانیسم‌های داخل سلولی و سرطان	

۳ متیل کلاترن (3-Methylcholantrene) در محیط آزمایشگاه (*in vitro*) توسط سلولهای مختلف سیستم لنفو-هموپوئیتیک (lymphohemopoietic) در مراحل به خصوصی از تمایز آنها رخ می دهد (۴،۲). در اوایل دهه ۱۹۸۰ نشان داده شد که کشت سلولهای طحال موش به مدت یک شب در محیط کشت حاوی IL-3 خاصیت کشندگی سلولی را افزایش می دهد (۱۵) و IL-3 باعث ادامه حیات سلولهای طحال موش در محیط کشت تا ۴۴ هفته می گردد (۵). علاوه بر این ثابت شده است که سلولهای طحال و مغز استخوان موش که توسط میتوزن کونکاناوالین A (Concanavalin-A) فعال شده اند در محیط کشت غنی از IL-3 به ماستوسیتهایی تمایز می یابند که فنوتیپ سطحی $CD90^+ Ig^- CD11b^- CD45^- FCR^+$ و $Ia^+ IgE^+$ را بروز می دهند (۲۷). علاوه بر این گزارش شده است که کشت سلولهای مغز استخوان موش در محیط حاوی IL-3 به ماستوسیتهایی با خاصیت NC (۹) و نیز به سلولهای چند هسته ای که مشابه استوکلاستها بودند تمایز می یابند.

منوکلونال آنتی بادی IC4 پروتئینی را در سطح برخی از سلولهای چند هسته ای موش شناسایی می نماید که NC-1.1 نامیده شده است. این رسپتور بیشترین سلول کشی طبیعی سلولها را سازماندهی می نماید (۲، ۱۱، ۲۴). همچنین نشان داده شده که تجویز این آنتی بادی به موش (*in vivo*) عمل سلول کشی سلولهای حیوان را حدود ۷۰ درصد کاهش می دهد و همچنین تجویز آن به حیوان موجب افزایش رشد برخی از انواع تومورهای پیوند شده (۲۳) و نیز افزایش قدرت سرطان زایی برخی از مواد شیمیایی می گردد (۳). مطالعات بعدی نشان داده است که NC-1.1 رسپتوری است که بر روی سلولهای سلول کش طبیعی وجود دارد و به لیگاندهای موجود بر روی برخی از سلولهای توموری اتصال برقرار می نماید (۳، ۱۱).

مقاله حاضر پژوهشی است که بر روی یک رده

سلولی بنام MCL (Mast Cell Line) انجام شده که برای رشدشان به IL-3 نیازمند هستند. این سلولهای از طریق کشت سلولهای طحال موش از نژاد CBA در محیط کشت حاوی IL-3 به دست آمده اند. با استفاده از NC-1.1 به عنوان یک شاخص (Marker) یا رسپتور برای سلولهای سلول کش طبیعی، بروز این رسپتور را بر حسب طول عمر سلولها در محیط کشت و نیز ناپدید شدن همزمان رسپتورهای دیگر بر روی این سلولها و نیز نقش آنها در کشتن سلولهای توموری WEHI-164 مورد بررسی قرار گرفته است. به علاوه مرفولوژی این سلولها توسط روشهای ایمونوشیمی و بیوشیمی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها:

مايع رویی حاصل از محیط کشت سلول WEHI-3B که حاوی اینتر لوكين -۳ بود را با محیط کشت (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) مخلوط و برای کشت سلولهای MCL مورد استفاده قرار گرفت. سلولهای طحال موش از نژاد CBA و در سن ۷ هفتگی به طور استریل استخراج و به صورت سوسپانسیون سلولی در آمده و با غلظت 2×10^6 سلول در هر میلی لیتر در محیط کشت حاوی IL-3 در فلاسکهای ۷۵ سانتیمتر مربعی کشت داده شد فلاسکها در $37^\circ C$ با ۵ درصد دی اکسید کربن و ۹۰ درصد رطوبت نگهداری گردیدند و هر دو روز یکبار نیمی از محیط کشت تجدید گردید تا سلولها مواد غذایی لازم را دریافت نمایند. بعد از یک دوره سه روزه کشت سرعت رشد و تکثیر سلولها در محیط کشت افزایش یافت به طوری که در هفته چهارم زمان دو برابر شدن آنها به ۷۲ ساعت رسید. بین هفته ۴ تا ۶ سلولها دچار مرگ ناگهانی (Crisis) شدند و اکثر آنها مردند. سلولهای باقی مانده شروع به تکثیر نموده و به مدت حدود ۴۰ هفته مورد مطالعه قرار گرفتند.

تلاشهای مکرر برای کلون کردن این سلولها که از هفته ۱۲ آغاز شد بی نتیجه بود چون هرگاه تعداد سلولها از ۳۰۰ سلول در هر چاهک ظرف آزمایش کمتر می شد تکثیرشان متوقف و نهایتاً سلولها می مردند. حتی با استفاده از محیط کشت حاوی میتومايسين C (Mitomycin-C) همراه با سلولهای طحال و تیموس به عنوان سلولهای تغذیه کننده (feeder cells) و نیز استفاده از آگار نرم (soft agar) موفقیتی در کلون نمودن سلولها حاصل نگردید.

منوکلونال آنتی بادیهای مورد استفاده:

در این مطالعه از منوکلونال آنتی بادیهای زیر استفاده گردید. آنتی بادی ضد NC-1.1 (IgG1) و آنتی بادی ضد (Ly60)، کلون 2B6F2 (IgG2)، توسط آزمایشگاه Dr.C.Smart تهیه گردیدند (۲۴، ۱۶). آنتی بادی ضد پروتئاز ماستوسیت (mMCP-5) از Dr.P.McNiel's (۱۸) و آنتی بادی ضد NK-1.1 کلون PK136 (IgG2b) از Dr.G.Koo دریافت شد (۱۳). آنتی بادی ضد FCRII/III (آنتی CD32/CD16)، کلون 2.4G2 (IgG1)، توسط Dr.P.Lalor از انستیتو تحقیقات پزشکی Walter & Eliza Hall Institute ملبورن استرالیا دریافت و آنتی بادی ضد $TNF-\alpha$ انسانی کلون 47 (IgG1)، (۲۱) توسط Dr.D.Rathjen از پتید تکنولوژی سیدنی استرالیا خریداری شد. آنتی بادیهای تجارتي عبارت بودند از آنتی بادی IgM کونزوگه شده با FITC (Tago, Burlingame، آمریکا) آنتی بادی ضد Thy1.2 کونزوگه شده با فیکواریترین (CD90, IgG2a) و آنتی بادی ضد Lyt.2 کونزوگه شده با فیکواریترین (CD8, IgG2a) از شرکت فارمین ژن سان دیگو خریداری گردیدند و آنتی بادی ضد L3T4 (anti-CD4, IgG2b) کونزوگه شده با FITC از شرکت بکتون دیکنسون آمریکا خریداری شدند. همچنین آنتی بادی Mac-1 کلون M1/70.15 (CD11b, IgG2b)

کونزوگه شده با بیوتین توسط شرکت کالتگ سانفرانسیسکو آمریکا تهیه گردید.

بیوتینه کردن (Biotinylation of MoAb) و کونزوگه کردن منوکلونال آنتی بادی با FITC (FITC Conjugation of MoAb)

روشهای ارائه شده توسط Harlow و Lane (۱۰) در مورد بیوتینه کردن آنتی بادی و نیز کونزوگه کردن آن با FITC با جزئی تغییراتی مورد استفاده قرار گرفت.

سیتوتوکسیته همراه با آزاد سازی کرومیوم ۵۱:

۵۱ کرومیوم رلیز سیتوتوکسی سیتی اسی (51Cr release cytotoxicity assay) سلول کشی طبیعی و کشندگی طبیعی سلولها در دوره های مختلف کشت به وسیله روش آزاد سازی کرومیوم پنجاه و یک (رادیو اکتیو) از سلولهای توموری YAC-1 و WEHI-164 کشته شده تعیین گردید (۲۴). اختصاراً سلولهای کشت داده شده در محیط کشت حاوی IL-3 را به تعداد cell/ml 1×10^7 با سلولهای توموری (که قبلاً با کرومیوم ۵۱ رادیو اکتیو شده بودند) YAC-1 برای تعیین کشندگی طبیعی و با WEHI-164 برای تعیین عمل سلول کشی طبیعی به نسبت های ۱/۵:۱ تا ۵۰:۱ از سلول مورد آزمایش با سلولهای توموری فوق مجاور در دمای 37°C در حضور ۵۰ درصد دی اکسید کربن و ۹۰ درصد رطوبت نگهداری شدند. تعداد سلولهای توموری در هر یک از چاهکهای ظرف آزمایش 1×10^4 سلول بود. پس از ۱۸ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی هر چاهک را جمع آوری کرده و میزان رادیواکتیویته محلول را که ناشی از رها شدن کرومیوم رادیواکتیو از سلولهای توموری کشته شده بود توسط گاما کانتیر (Counter Gamma-Cobra) اندازه گیری گردید. سپس با استفاده از فرمول زیر درصد لیز اختصاصی محاسبه گردید و برای مقایسه آزمایشات انجام شده مختلف

$$100 \times \frac{\text{cpm خودبخودی} - \text{cpm نمونه مورد آزمایش}}{\text{درصد لیز اختصاصی}} = \frac{\text{cpm خودبخودی} - \text{cpm کل}}{\text{درصد لیز اختصاصی}}$$

نتایج به (LU) Lytic Unit برای 10^4 سلول طحال برگردانده شد.

یک LU عبارت است از تعداد سلولهای عملگری که لازم است تا ۲۰ درصد از 10^4 سلول هدف رالیز نماید که از روی شیب منحنی درصد لیز اختصاصی (Specific lysis) نسبت سلول عملگر به هدف (E:T Ratio) محاسبه گردید.

برای تعیین اثر آنتی بادیهای ضد NC-1.1 بر توقف یا کاهش سلول کشی سلولهای MCL آنتی بادی ضد NC-1.1 (MoAb1C4) را با سلولهای MCL مجاور نموده و پس از یک ساعت سلولها را شسته و آنها را در ظرفهای آزمایش ۹۶ چاهکی به نحوی که در بالا ذکر گردید با سلولهای توموری مجاور شدند.

آنالیزهای ایمونوهیستولوژی (Immunohistological Analysis):

سلولهای MCL پس از شستشو با PBS (Phosphate buffered Saline) بر روی لامهای پوشیده شده از ژلاتین سیتوساتریفوژ شد و پس از خشک شدن در هوای آزمایشگاه به مدت ده دقیقه با استون و یا ۳۰ دقیقه با محلول کارنوی (Carnoy's solution) (۶۰ درصد متانول، ۳۰ درصد کلروفرم، ۱۰ درصد اسید استیک گلاسیال) ثابت شدند. سلولها با (الف) به مدت یک ساعت با آنتی بادی ضد mMCP-5 به غلظت ۱/۳۰ g/ml (۱۸) ۲۰ در شرایط اتاق رنگ آمیزی شدند. سپس به وسیله آنتی بادی ضد خرگوشی بز کونژوگه شده با بیوتین (Biotin-Conjugated goat anti-rabbit Ig) و پراکسیداز کونژوگه شده با استرپت آویدین (Streptavidin) و هیدروژن پراکسید DAB قابل رؤیت شدند یا (ب) با آلسین بلو (Alcian blue) رنگ آمیزی شده و برای مشاهده گرانولهای ماستوسیت رنگ آمیزی زمینه (Counterstain) با نوکلترفاست رد

(Nuclear fast red) انجام شد. یا (ج) به تنهایی با رایت گیمسا رنگ آمیزی گردید.

ایمونوبلاتینگ (Immunoblotting):

برای تهیه لیز شده سلولی (Cell lysate) 10^7 سلول MCL را در ۱۰۰ میکرولیتر PBS حاوی یک درصد تریتون ۱۰۰ (Triton X-100) و یک دهم درصد SDS ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در روی یخ نگهداری شدند سپس با سونیفایر (Sonifier) با ۱۰ پالس سونیکیت (Senicart) گردیدند. بیست میکرولیتر از لیزات (2×10^6 سلول) را با مقدار مساوی از رانینگ بوفر (SDS-PAGE (running buffer) مخلوط و با پلی اکریل آمید (Polyacrylamide) ده درصد الکتروفورز گردید. پروتئین الکتروفورز شده به کاغذ P.V.D.F منتقل شده و بلات (Blot) حاصل به مدت یک شب در محلول دو درصد BSA/TBS قرار گرفت تا محلهای غیر اختصاصی آن مسدود گردند. سپس با ۲ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بادی ضد mMCP-5 تأیید گردیدند. در پایان با ایمونوگلوبولین ضد خرگوشی بز کونژوگه شده با بیوتین و یا پراکسیداز کونژوگه شده با استرپت آویدین و هیدروژن پراکسیداز DAB قابل رؤیت گردیدند.

RNA بلاتینگ (RNA-blotting):

RNA سلولهای MCL با استفاده از روش Chomczynski و Secchi (۵) جدا گردید. بیست میکروگرم از نمونهها بر روی ژل آگاروز - فورمالدئید ۱/۳ درصد (Agarose formaldehyde) الکتروفورز شدند و به روش واکيوم بلاتینگ (Vacuum blotting) بر روی غشاهای نایلونی (Nylon membranes) انتقال داده شدند. بلاتهای RNA حاصل با پروبهای DNA Gene-Specific متصل شده به $[32-P]$ dCTP مخصوص پروتئاز ماستوسیتهای موش (mMCP-2) و mMCP-5 (۱۷) به مدت یک ساعت در دمای 68°C با

استفاده از محلول Quikhyb hybridization مجاور و سپس اتورادیوگراف گردیدند.

بررسی خاصیت بیگانه خواری سلولهای MCL:

(Phagocytosis of sheep Red Blood Cells)

برای تعیین این که آیا سلولهای MCL ماکروفاژند یا خیر آزمایش زیر انجام گردید:

به طور اختصار گلبول قرمز خون گوسفند را به غلظت 5×10^8 در هر میلی لیتر خون را با ۱۰ درصد ایمونوگلوبولین موشی تهیه شده بر علیه گلبولهای قرمز خون گوسفند مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 37°C مجاور گردیدند. گلبولهای قرمز را که بدین نحو اپسونیزه (Opsonized) شده بودند به نسبت مساوی با سلولهای MCL و یا سلولهای صفاق موش (به عنوان کنترل مثبت) مخلوط کرده و بر روی روتاتور گذاشته و با سرعت یک دور در دقیقه در دمای 37°C به آرامی مخلوط شدند.

پس از ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیونهای سلولی را برداشته و پس از دو بار شستن با محلول سرد HBSS در شرایط اتاق، سلولها بر

روی لامهای پوشیده شده از ژلاتین سیتوساتریفوژ شدند و برای مشاهده عمل بلع گلبولهای قرمز خون گوسفند توسط دو گروه سلول مذکور مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند.

آنالیز فلوسیتومتری (Flow Cytometric Analysis):

سلولهای MCL را در هفته های ۲، ۴، ۵، ۹، ۱۲ و ۱۶ کشت سلولی، شسته و تعداد آنها در محلول PBS حاوی ۱ درصد سرم گوساله به 5×10^5 سلول در هر میلی لیتر رسانده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را در هر لوله مخصوص فلوسیتومتری ریخته و به هر یک ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی ضد رسپتور FC (CD32/CD16) برای مسدود کردن شاخص FC اضافه گردید. لوله ها تکان داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند. پس از شستن سلولها با PBS و ساتریفوژ کردن با دور ۳۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد به هر کدام از لوله ها ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی مربوطه اضافه گردید و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در روی یخ مجدداً سلولها را با PBS شسته و این بار ۱۰۰ میکرولیتر محلول رقیق شده کمپلکس

جدول شماره ۱: فنوتیپ سلولهای طحال موش بر حسب زمان در محیط کشت حاوی اینتر لوکین ۳-

رسپتورهای سطحی سلول*										
TNF- α	CD16/CD32	IgM	CD11b	CD8	CD4	CD90	Ly60	NK-1.1	NC-1.1	زمان کشت بر حسب هفته
۰	81 ± 5	11 ± 1	۱۴	۴	۳	26 ± 4	11 ± 3	5 ± 1	11 ± 1	۱
۰	76 ± 20	2 ± 2	6 ± 4	۱	۰	۱	9 ± 1	۱	17 ± 3	۴
ND**	۹۶	۰	2 ± 2	۱	۰	۱	۱	۰	52 ± 3	۵
ND	۸۴	۰	2 ± 2	۰	۰	۰	5 ± 5	۱	39 ± 6	۹
۰	۸۸	۱	۳	۱	۰	۰	۰	2 ± 2	49 ± 1	۱۲
ND	86 ± 4	۰	۳	۱	۱	۱	۱	۱	48 ± 5	۱۶

* میانگین درصد سلولهای مثبت \pm SEM حداقل دو آزمایش، اندازه گیری شده با فلوسیتومتری.
 **ND انجام نشده است.

جدول شماره ۲: نتایج آزمایشات تیپیک جهت تعیین اثر منوکلونال آنتی بادی 1C4 بر سلول کشی طبیعی سلولهای MCL بر حسب زمان کشت

سلول کشی بر حسب لیتیک یونیت به ازاء هر 10^4 سلول			
زمان کشت بر حسب هفته	کنترل	1C4 تأثیر داده ها	کاهش بر حسب لیتیک یونیت (%)
۲	۱۱۱۱	۷۶۹	۳۰
۴	۲۱۷۳	۹۴۳	۵۷
۸	۱۳۸۹	۵۵۵	۶۰
۱۶	۱۰۰۰۰	۱۷۸۶	۸۲

اضافه گردید و مجدداً هر لوله به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند. پس از شستن سلولها ۲۵۰ میکرولیتر PBS به هر لوله اضافه و در دستگاه فلو سیتومتری آنالیز شدند.

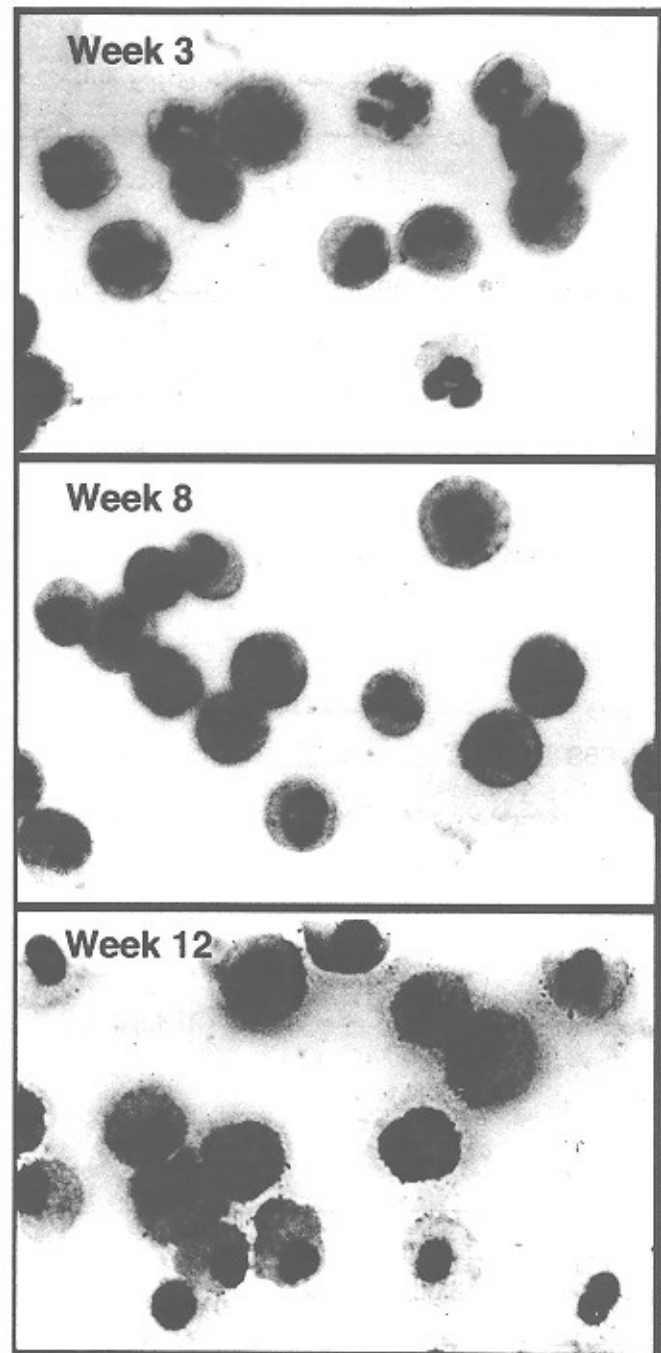
نتایج:

فنوتیپ و مرفولوژی سلولها MCL.

با استفاده از منوکلونال آنتی بادهای موجود بر علیه شاخصهای مختلف سلولهای هموپوئیتیک (hemopoietic) از جمله سلولهای T (CD8, CD4, CD90) سلولهای B (IgM)، سلولهای NK (NK-1.1)، ماکروفاژها (CD11b) و سلولهای سلول کش طبیعی (NC-1.1)، CD32/CD16، Ly6c و $TNF-\alpha$ و فنوتیپ سلولهای MCL در مراحل مختلف رشد مورد بررسی قرار گرفت.

همانگونه که در جدول شماره ۱ آمده است بعد از دو هفته این سلولها مقدار ناچیزی از غالب شاخصها را به جز CD32/CD16 به مقدار ۸۱ درصد و CD90 به مقدار ۲۶ درصد بروز دادند.

در هفته پنجم شاخص NC-1.1 به میزان ۵۲ درصد افزایش یافته و به طور همزمان سایر شاخصها به جز



تصویر شماره ۱: تصویر سلولهای MCL پس از ۳، ۸ و ۱۲ هفته کشت در محیط حاوی IL-3، رنگ آمیزی شده با رایت گیمسا.

استریت آویدین FITC (Streptavidin-FITC) به لوله ها

CD32/CD16 ناپدید گردیدند. این الگوی بروز شاخصهای سطحی در طول مطالعه بدون تغییر باقی ماند.

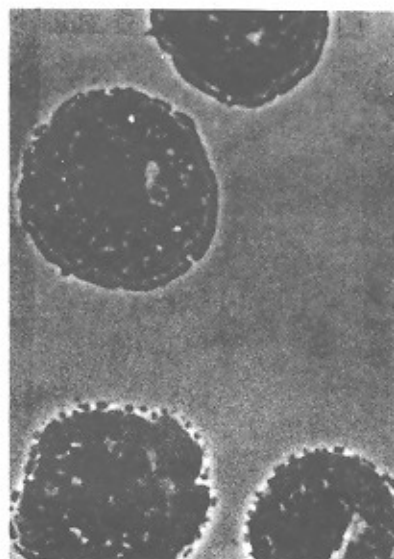
از نظر مرفولوژی این سلولها تغییراتی را بر حسب طول عمرشان در محیط کشت نشان دادند. به طوری که در هفته سوم این سلولها نابالغ و از نظر تقسیم سلولی فعال و چند هسته‌ای بودند در صورتی که در هفته ۱۲ عمدتاً تک هسته‌ای و دارای دانه‌های درشت حاوی گرانول بودند (تصویر شماره ۱).

در هفته دوازدهم، ۹۵ درصد سلولها را سلولهای تک هسته‌ای بزرگ با سیتوپلاسم فراوان و همراه با گرانولهای هتروژن بی شباهت به ماکروفاژها و ماستوسیتها، ۲ درصد بلاست، ۲ درصد میلوبلاست/پرومیلوبلاست/میلویت و ۱ درصد متامیلوسیت/نوتروفیل بودند. به علاوه بیش از ۹۰ درصد این سلولها به شدت با Alcian blue رنگ آمیزی اختصاصی موسین ماستوسیتها (۲۵) رنگ گرفتند. تصویر شماره ۲ مثالی از این رنگ آمیزی می‌باشد. به علاوه این سلولها گلبولهای قرمز گوسفند را در مقایسه با کنترل مثبت نمی‌بلعند. نتایج نشان داده‌اند که بیش از ۹۵ درصد سلولهای طحال موش CBA بعد از ۱۲ هفته در محیط کشت IL-3 حاوی مرفولوژی ماستوسیتها را داشته‌اند.

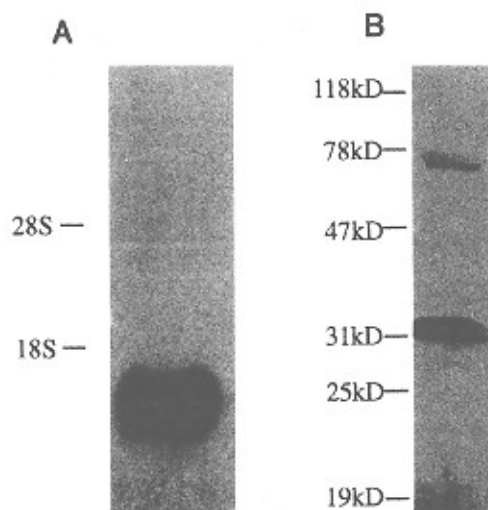
اختصاصات بیوشیمیایی ماستوسیتها:

(Biochemical Characterization of Mast Cells)

وقتی RNA کل به وسیله cDNA اختصاصی ژن mMCP بررسی گردید این ژن در قالب mRNA به میزان ۱ کیلو بیس (۱۰۰۰) مشخص گردید، (تصویر A۳) که به صورت پروتئینی به وزن 31-KDa که با ایمونوگلوبولین اختصاصی ضد mMCP-5 به روش ایمونوبلائیگ بر روی سلولهای لیز شده واکنش داده شد، تأیید گردید (تصویر B۳). همچنین بررسی ایمونوشیمی وجود گرانولها را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۲: تصویری از سلولهای MCL پس از ۱۲ هفته در محیط کشت که توسط آلسین بلو رنگ آمیزی شده است.



تصویر شماره ۳: بروز mMCP-5 بر روی سلولهای MCL پس از ۲۸ هفته کشت. در بخش A، ۲۰ میکروگرم از RNA الکتروفورز شده و سپس با cDNA اختصاصی برای mMCP-5 ثابت گردید. در بخش B، سلول لیز شده پس از الکتروفورز با آنتی بادی ضد mMCP-5 ثابت گردیده است.

سلول کشی طبیعی سلولهای MCL:

بررسیهای سلول کشی به عمل آمده بر روی سلولهای MCL نشان داد که این سلولها ظرف ۱۸ ساعت حداکثر سلول کش طبیعی خود را علیه سلولهای توموری W6H1-164 (حساس به NC) نشان می دهند (تصویر A۵). این سلولها در عین حال هیچگونه تأثیری بر سلولهای توموری YAC-1 (حساس به NK و مقاوم به NC) نداشته اند (شکل B۵). در این بررسیها منوکلونال آنتی بادی IC4 (ضد NC-1.1) عمل سلول کشی طبیعی سلولهای MCL را در هفته چهارم کشت به میزان ۵۷ درصد و در هفته ۱۶ کشت به میزان ۸۲ درصد کاهش دادند (جدول شماره ۲).

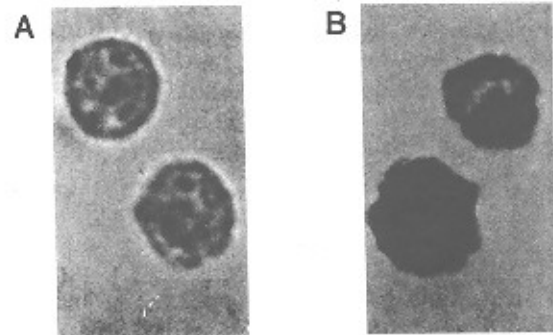
بحث:

کشت لکوسیتهای طحال موش CBA در محیط کشت حاوی IL-3 به تمایز سلولهای منجر گردید که ماستوسیتهای وابسته به IL-3 یا MCL نامیده شدند. ۵۰ درصد این سلولها پروتئینی موسوم به NC-1.1 که مسئول سلول کش طبیعی (NC) در موش می باشد را بروز می دهند (۲۴، ۱۱).

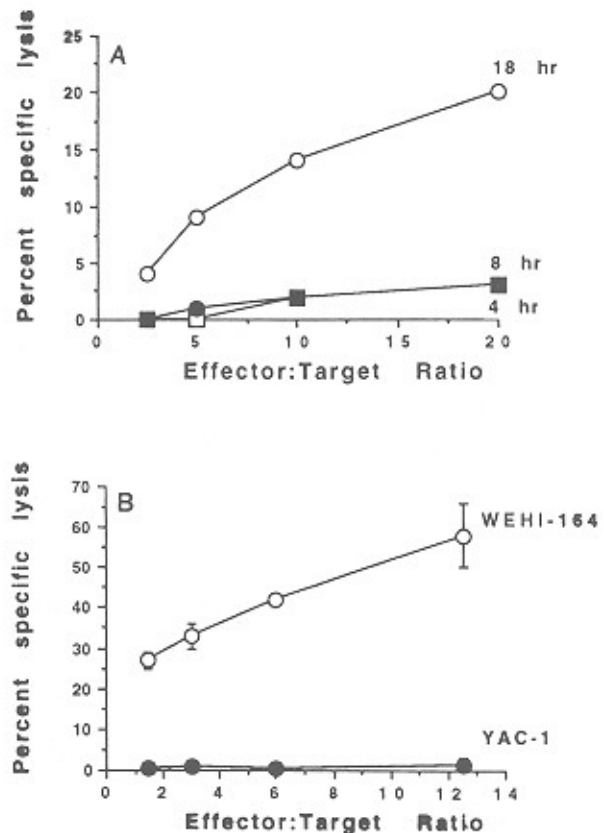
پس از ۵ هفته کشت سلولی همزمان با افزایش بروز رسپتور NC-1.1 سایر شاخص ها ناپدید گردیدند به طوری که فنوتیپ سطحی ثابت و نهایی سلولهای MCL در این موقع NC-1.1 و CD32/CD16 مثبت و شاخصهای CD90، CD8/CD4، CD11b، sIgM، Ly6c، NK-1.1 تماماً منفی بوده است.

این فنوتیپ مشابه فنوتیپی است که پس از کشت سلولهای مغز استخوان موش در محیط کشت حاوی ConA به دست آمده است (۲۷).

ظهور رسپتور NC-1.1 در این سلولها پیشنهاد می کند که IL-3 سلولهای بنیادی (stem cells) طحال را در جهت تمایز به ماستوسیتهایی با قدرت لیز سلولهای توموری حساس به سلول کشی طبیعی تحریک می نماید.



تصویر شماره ۴: رنگ آمیزی سلولهای MCL به روش ایمونوپراکسیداز با استفاده از IgG نرمال خرگوش (A) و آنتی بادی ضد mMCP-5 (B).



تصویر شماره ۵: سلولهای MCL کشت داده شده در محیط حاوی IL-3 سینتیک مشخصی را بر علیه سلولهای توموری W6H1-164 نشان می دهد (A). این سلولها سلول کشی طبیعی را بر علیه W6H1-164 نشان می دهند ولی تأثیری بر سلولهای توموری YAC-1 ندارند (B).

همانگونه که قبلاً نشان داده‌ایم عمل سلول کشی طبیعی (NC) سلولهای نرمال طحال موش CBA با LU20 بین 140-500 بوده است (۲۴).

در این مطالعه کشت سلولهای طحال موش CBA در محیط کشت حاوی IL-3 باعث افزایش سلول کشی طبیعی ظرف ده هفته می‌شود که این افزایش با ازدیاد طول دوره کشت سلولی بیشتر شده به طوری که پس از ۱۶ هفته کشت تا ۲۰ برابر سلولهای کشت نشده رسید (جدول شماره ۲).

همان گونه که قبلاً گزارش شده (۷) و ما نیز در این مطالعه مشاهده نمودیم، کشت سلولهای طحال در محیط کشت غنی از IL-3 باعث از بین رفتن خاصیت کشندگی سلولهای کشنده طبیعی (NK)، در از بین بردن سلولهای توموری YAC-1 در کمتر از دو هفته می‌شود. این خود تأییدی است بر نقش IL-3 در تکثیر و تمایز سلولهای NC است و نه NK.

تا به امروز ماستوسیت‌هایی که توسط IL-3 از سلولهای طحال موش حاصل شده باشند گزارش نشده است در مقابل گزارش شده است که سلولهای مغز استخوان موش در محیط کشت حاوی IL-3 به ماستوسیتها یا شبه ماستوسیت‌هایی تبدیل می‌شوند که عمل سلول کشی طبیعی را دارا بوده و ژنهای زنجیره بتا (β -chain) رسپتور سلولهای T را باز سازی نمی‌کند (۹، ۱۲) و این سلولها تا چهار ماه در محیط کشت دوام داشته‌اند (۹).

از نظر مورفولوژی سلولهای MCL شبیه ماکروفاژ و یا ماستوسیت بودند. آزمایشات بیگانه خواری (Phagocytosis studies) نشان داد که این سلولها ماکروفاژ نبوده و در مقایسه با سلولهای کنترل قادر به بلع گلبولهای قرمز گوسفند (SRBC) نیستند. این نتایج با عدم بروز شاخص CD11b که مخصوص ماکروفاژها می‌باشد تأیید گردید (جدول شماره ۱).

حال آنکه نتایج رنگ آمیزی با آلکسین بلو

(Alcain blue) و نیز بررسی وجود پروتئاز mmCP-5 در سطح مولکولی و نیز پروتئینی ماستوسیت بودن آنها تأیید گردیده است.

به طور اختصار ما نشان داده‌ایم که کشت لکروسیت‌های طحال موش CBA در حضور IL-3 منجر به تمایز گروهی از ماستوسیت‌های نابالغ می‌گردد که MCL نامیده شدند. اگر چه تقریباً تمام سلولهای MCL ماستوسیت بودند ولی آنها را نمی‌توان به عنوان یک رده سلولی خالص (Cell line) تلقی کرد. در واقع ضرورت حضور بیش از ۳۰۰ سلول در هر چاهک ظرف کشت سلول، حکایت از واکنش بین دو یا بیشتر سلولهای مشخصی دارد که برای زنده ماندن یکدیگر لازم هستند. به علاوه تنها ۵۰ درصد سلولها رسپتور NC-1.1 را داشته‌اند، که حکایت از وجود حداقل دو گروه سلولی با منشاء ماستوسیت دارد.

به علاوه این سلولها رسپتوری برای $\text{TNF-}\alpha$ ندارد (جدول شماره ۱) لذا احتمالاً مکانیسمی که برای سلول کشی خود به کار می‌برند از طریق $\text{TNF-}\alpha$ نمی‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود پژوهش بیشتری در زمینه فاکتور یا فاکتورهای مؤثر در سلول کشی این سلولها به عمل آید. علیرغم توجه سایر منابع علمی بر این که سلول کشی طبیعی را با $\text{TNF-}\alpha$ در کشتن سلولهای توموری برابر می‌دانند ما اعتقاد داریم که تعریف سلول کشی طبیعی (NC) نیازمند توضیح بیشتری می‌باشد. استنتاج ما این است که مکانیسم سلول کشی طبیعی (NC) بایستی ابتدائاً بر حسب اثرات متقابل رسپتور - لیگاند و نه رخدادهای سیتوتوکسیک آنها تعریف گردد.

تشکر و قدردانی:

نویسنده از همکاریهای بی دریغ Dr.C.Smart و پروفیسور R.Burton از دانشگاه نیوکاسل استرالیا در انجام این پژوهش و نیز وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به خاطر کمک مالی تشکر می‌نماید.

References:

- 1- Barton BE.; Mayer R. IL-3 induces differentiation of bone marrow precursor cells to osteoclast-like cells. *J Immunol*, 143: 3211-16, 1989.
- 2- Brien JH.; Smart YC.; Farrelly ML.; Burton RC. Phenotype and morphology of murine NC-1.1+ natural cytotoxic cells. *Immunol Cell Biol*, 72: 161-8, 1994.
- 3- Burton RC.; Smart YC. Natural cytotoxic cells mediate immunosurvivalance against 3-methylcholanthrene and mineral oil carcinogenesis in mice. *Natural Immunity*, 13: 227-32, 1994.
- 4- Bykowski MJ.; Stutman O. The cells responsible for murine natural cytotoxic (NC) activity: a multi-lineage system. *J Immunol*, 13(7): 1120-6, 1986.
- 5- Chomczynski P.; Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162: 156-9, 1987.
- 6- Clarke GR.; Shirzadeh H.; Pang G.; Beagley KW.; et al. TNF- α is not the sole mediator of WEHI-164 tumor cell killing in natural cytotoxicity. *Cytokine*, 9: 254-62, 1997.
- 7- Djeu JY.; Lanze E.; Pastore S.; Hapel AJ. Selective growth of natural cytotoxic but not natural killer effector cells in interleukin-3. *Nature*, 306: 788-91, 1983.
- 8- Gordon JR.; Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α cachectin. *Nature*, 346: 274-6, 1990.
- 9- Ghiara P.; Boraschi D.; Villa L.; Scapigliati G.; et al. *In vitro* generated mast cells express natural cytotoxicity against tumour cells. *Immunology*, 55: 317-24, 1985.
- 10- Harlow E.; Lane D. In: *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York: USA, 319: 319-58, 1988.
- 11- Holmgren SP.; Wang X.; Clarke GR.; Noltorp RS.; et al. Phosphorylation of the NC-1.1 receptor and regulation of natural cytotoxicity by protein kinase C and cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Immunol*, 158: 2035-41, 1997.
- 12- Jadus MR.; Schmunk G.; Djeu JU.; Parkman R. Morphology and lytic mechanisms of interleukin 3-dependent natural cytotoxic cells: tumour necrosis factor as a possible mediator. *J Immunol*, 137: 2774-83, 1986.
- 13- Koo GC.; Peppard JR. Establishment of monoclonal anti-NK-1.1 antibody. *Hybridoma*, 3: 301-3, 1984.
- 14- Lee JC.; Hapel AG.; Ihle JN. Constitutive production of a unique lymphokine (IL3) by the WEHI-3 cell line. *J Immunol*, 128: 2393-8, 1982.
- 15- Lattime EC.; Pecoraro GA.; Stuman O. The activity of natural cytotoxic cells is augmented by interleukin-2 and interleukin-3. *J Exp Med*, 157: 1070-5, 1983.
- 16- Martiniello R.; Smart YC.; Burton RC. Monoclonal antibody 2B6-F2 identifies a subset of murine natural killer cells with receptors for YAC-1 and WEHI-164 targets. *Cell Immunol*, 156: 155-69, 1994.
- 17- McNeil HP.; Austen KF.; Somerville LL.; Gurish MF.; et al. Molecular cloning of the mouse mast cell protease-5 gene: a novel secretory granule protease expressed early in the differentiation of serosal mast cells. *J Biol Chem*, 266: 20316-22, 1991.
- 18- McNeil HP.; Frenkel DP.; Austen KF.; Friend DS.; et al. Translation and granule localization of mouse mast cell protease-5. Immunodetection with specific antipeptide Ig. *J Immunol*, 149(7): 2466-72, 1992.

- 19- Ortaldo JR.; Mason LH.; Mathieson BJ.; Liang SM.; et al. Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumour necrosis factor. *Nature*, 321: 700-1, 1986.
- 20- Richards AL.; Okuno T.; Takagaki Y.; Djeu JY. Natural cytotoxic cell- specific cytotoxic factor produced by IL-3-dependent basophilic/ mast cells- relationship to TNF. *J Immunol*, 141(28): 3061-6, 1988.
- 21- Rathjen DA.; Cowan K.; Furphy LJ.; Aston R. Antigen structure of human tumour necrosis factor, recognition of distinct regions of TNF- α by different tumour cell receptors. *Mol Immunol*, 28: 79-86, 1991.
- 22- Serafin WE.; Reynolds DS.; Rogelj S.; Lane WS.; et al. Identification and molecular cloning of a novel mouse mucosal mast cell serine protease. *J Biol Chem*, 265: 423-9, 1990.
- 23- Smart YC.; Farrelly ML.; Burton RC. Correlation of growth of tumours in NC-cell-depleted mice with NC- and NK-cell-mediated lysis *in vitro*. *Int J Cancer*, 50: 817-21, 1992.
- 24- Smart YC.; Stevenson KL.; Farrelly ML.; Burton RC.; et al. Production of monoclonal allo-antibody to murine natural cytotoxic cells. *Immunol Cell Biol*, 68: 277-84, 1990.
- 25- Smith A.; Bruton J. A colour atlas of histological staining techniques. Wolfe Medical Publication Ltd, London, 1997.
- 26- Stutman O.; Dien P.; Wisun RE.; Lattime EC. Natural cytotoxic cells against solid tumour in mice: blocking of cytotoxicity by D mannose. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 77: 2895-8, 1980.
- 27- Tertian G.; Yung YP.; Guy-Grand D.; Moore MA. Long-term *in vitro* culture of murine mast cells. I. Description of a growth factor -dependent culture technique. *J Immunol*, 127: 788-94, 1981.
- 28- Wright SC.; Bonavida B. Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity. VII. Functional comparison of human natural killer cytotoxic factors with recombinant lymphotoxin and tumor necrosis factor. *J Immunol*, 138: 1791-8, 1987.